

10/533878

JP03/14201  
Rec'd PGI/PTO 05 MAY 2005日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

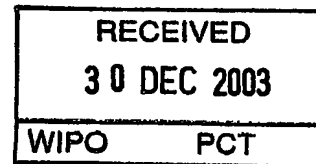
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 2 年 1 1 月    8 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 2 - 3 2 6 1 9 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 2 - 3 2 6 1 9 3 ]

出      願      人      高 橋   弘  
Applicant(s):      花 田   修 一

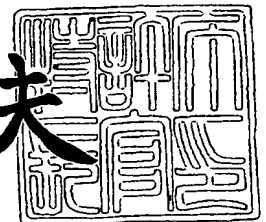


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 1 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 2 5 4 (

【書類名】 特許願  
【整理番号】 02810  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/50  
【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県岩槻市大字柏崎 8 0 8

【氏名】 高橋 弘

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島市桜ヶ丘六丁目 3 9 番 1 1 号

【氏名】 花田 修一

【特許出願人】

【住所又は居所】 埼玉県岩槻市大字柏崎 8 0 8

【氏名又は名称】 高橋 弘

【特許出願人】

【住所又は居所】 鹿児島市桜ヶ丘六丁目 3 9 番 1 1 号

【氏名又は名称】 花田 修一

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03-3238-9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ガン細胞の検査方法及びそのための試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 SF-25抗原を細胞表面上に発現している、生体から分離されたガン細胞を、該ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用して磁性ビーズに結合させ、次いで、磁性ビーズを磁力により集め、磁性ビーズ上に結合された前記ガン細胞を検査することを含むガン細胞の検査方法。

【請求項2】 前記ガン細胞を、前記磁性ビーズに結合させる工程は、抗SF-25抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した磁性ビーズと、前記ガン細胞とを抗原抗体反応させることにより行われるか、又は、標識した若しくは標識していない抗SF-25抗体若しくはその抗原結合性断片と前記ガン細胞とを抗原抗体反応させ、次いで若しくはこれと同時に、生成された抗原抗体複合物と特異的に結合する物質を固定化した磁性ビーズと該生成された抗原抗体複合物とを反応させることにより行われる請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記ガン細胞が、血液、脳脊髄液、骨髓、胸水、腹水、脾液、十二指腸液、胆汁又は尿中に含まれるガン細胞である請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記ガン細胞が、白血病細胞、大腸ガン細胞、胃ガン細胞、肺ガン細胞、乳ガン細胞、脾臓ガン細胞又は肝臓ガン細胞である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記ガン細胞が単核球である請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記検査が遺伝子検査である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片を固定化した磁性ビーズを含む、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法を行うためのガン細胞検査用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ガン細胞の検査方法及びそのための試薬に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

従来より、細胞上に発現される特徴的な抗原をマーカーとして利用し、該特徴的抗原を発現している細胞を収集することが行われている。現在、最も一般的に行われている方法は、蛍光標識した抗体を細胞上の抗原と反応させ、細胞上に結合された抗体の蛍光標識を利用したフローサイトメトリーに基づいて細胞を分離する方法であり（例えば、日経バイオ最新用語辞典第5版「セルソーター」の項）、この装置はセルソーターと呼ばれている。しかしながら、セルソーターは1台が数千万円もする高価な装置であり、便利ではあるが、収集される細胞集団の純度は必ずしも満足できるほど高くはない。

## 【0003】

また、細胞表面上に発現されるマーカー抗原に対する抗体を固定化した磁性ビーズを用いて該マーカー抗原を細胞表面上に発現している細胞を分離、収集する方法も知られている（例えば、特表平8-510390号公報及び特表2001-522806号公報）。しかしながら、磁性ビーズを用いて収集した細胞集団を、ガンの検査に用いることは知られていない。

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、高価な装置を用いることなく、簡便に効率良くガン細胞の検査を行うことができる方法及びそのための試薬を提供することである。

## 【0005】

## 【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗SF-25抗体を利用して、抗SF-25抗原を発現しているガン細胞を磁性ビーズに結合させて収集し、磁性ビーズ上に結合された細胞を検査することにより、ガンの診断を行うことができることを見出し、本発明を完成した。

## 【0006】

すなわち、本発明は、SF-25抗原を細胞表面上に発現している、生体から分離されたガン細胞を、該ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反

応を利用して磁性ビーズに結合させ、次いで、磁性ビーズを磁力により集め、磁性ビーズ上に結合された前記ガン細胞を検査することを含むガン細胞の検査方法を提供する。また、本発明は、抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片を固定化した磁性ビーズを含む、上記本発明の方法を行うためのガン細胞検査用試薬を提供する。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

上記の通り、本発明のガン細胞の検査方法では、SF-25抗原を細胞表面上に発現している、生体から分離されたガン細胞を、該ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用して磁性ビーズに結合させる。

#### 【0008】

SF-25抗原は、1987年に発見された分子量約125 kDaの公知の糖タンパク抗原である(W089/05307, 欧州特許第0 397 700号、米国特許第5,212,085号、Takahashi H, Wilson B, Ozturk M, Motte P, Strauss W, Isselbacher KJ and Wands JR. In vivo localization of colon adenocarcinoma by monoclonal antibody binding to a highly expressed cell surface antigen. Cancer Research 1988; 48: 6573-6579.、Wilson B, Ozturk M, Takahashi H, Motte P, Kew M, Isselbacher KJ and Wands JR. Cell surface changes associated with transformation of human hepatocytes to the malignant phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 3140-3144.、Takahashi H, Carlson R, Ozturk M, Sun S, Motte P, Strauss W, Isselbacher KJ and Wands JR, Shouval D. Radioimmunolocalization of hepatic and pulmonary metastasis of human colon adenocarcinoma. Gastroenterology 1989; 96: 1317-1329.、Hurwitz E, Stancovski I, Wilcheck M, Shouval D, Takahashi H, Wands JR, Sela M. A conjugate of 5-Fluorouridine-poly(L-lysine) and an antibody reactive with human colon carcinoma. Bioconjugate Chemistry 1990; 1: 285-290.、Wands JR, Takahashi H. Studies on cell surface changes associated with transformation of human hepatocytes to the malignant phenotype and their role as potential immunotargeting sites. In Frontiers of Mucosal Immunology. Volume 2. Eds by Ts

uchiya M. 1991 pp. 295-298. Hurwitz E, Adler R, Shouval D, Takahashi H, Wands JR, Sela M. Immunotargeting of daunomycin to localized and metastatic human colon adenocarcinoma in athymic mice. Cancer Immunology Immunotherapy 1992; 35: 186-192.、Takahashi H, Nakada T, Puisieux I. Inhibition of human colon cancer growth by antibody-directed human LAK cells in SCID mice. Science 1993; 259: 1460-1463.、Takahashi H, Nakada T, Nakaki M, Wands JR. Inhibition of hepatic metastases of human colon cancer in nude mice by a chimeric SF-25 monoclonal antibody. Gastroenterology 1995; 108: 172-182.。SF-25抗原は、ヒト結腸腺腫細胞株(例えば、LS 180 (ATCC No. CLO187), COLO 320 (ATCC No. CCL-220.1), WiDr (ATCC No. CCL-218), Caco-2 (HTB-37)や、ヒト肝臓癌細胞株(例えばFOCUS (Lun H. et al., in Vitro 20; 493-504(1984))の表面上に発現していることが知られている。また、抗SF-25モノクローナル抗体も公知であり(WO89/05307, 欧州特許第0 397 700号、米国特許第5,212,085号)、抗SF-25モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがATCCに寄託されている(ATCC No. HB9599)。

#### 【0 0 0 9】

抗SF-25抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。上記の通り、抗SF-25モノクローナル抗体は公知であり、寄託もされている。寄託されている、ハイブリドーマATCC No. HB9599により産生されるモノクローナル抗体は、上記したヒト肝臓癌細胞株FOCUSを免疫原としてマウスに免疫し、常法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、得られたモノクローナル抗体のうち、上記した各種ヒト結腸腺腫細胞株と抗原抗体反応するモノクローナル抗体を選択することにより得られた。本発明の方法には、この寄託された抗SF-25モノクローナル抗体を用いることもできるし、同様な方法で作製される他のモノクローナル抗体を用いることもできる。なお、ATCC No. HB9599を記載しているWO89/05307, 欧州特許第0 397 700号及び米国特許第5,212,085号の実施例に具体的に記載されているように、上記の方法により、抗SF-25モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ATCC No. HB9599以外にも1回の作製操作で多数得られているから、抗SF-25モノクローナル抗体は、公知の方法により容易に作製可

能なものであり、したがって、本発明の方法に用いられるモノクローナル抗体は、寄託されたハイブリドーマが産生するものに限定されるものではない。また、抗体自体のみならず、FabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、抗原との結合性を有する断片も用いることができる。

#### 【0010】

磁性ビーズは、ラテックス粒子やポリスチレン粒子に、フェライトを配合する等の方法により磁性を持たせた粒子であり、これに抗原又は抗体を担持させたものは免疫測定分野において周知であり、市販もされている。本発明の方法においては、免疫測定用の市販の磁性ビーズを好適に使用することができる。

#### 【0011】

SF-25抗原を細胞表面上に発現している、生体から分離されたガン細胞を、該ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用して磁性ビーズに結合させる方法には、直接法と間接法があり、いずれをも採用することができる。直接法は、磁性ビーズに抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片を固定化し、これとガン細胞との間の抗原抗体反応により、ガン細胞を磁性ビーズに直接結合させる方法である。直接法は、抗原抗体反応が1回でよいので迅速、簡便に実施できる利点がある。

#### 【0012】

磁性ビーズに抗体又はその抗原結合性断片を固定化する方法自体は周知である。例えば、抗体又はその抗原結合性断片の溶液に磁性ビーズを加え、磁性ビーズ上に抗体又はその抗原結合性断片を物理吸着させることにより行うことができる。この場合、混合物中の抗体又はその抗原結合性断片の濃度は、特に限定されないが、通常、0.001~1重量%程度であり、磁性ビーズの濃度は、特に限定されないが、通常、0.1~50重量%程度である。また、物理吸着の条件は特に限定されないが、通常、4℃~45℃で0.5時間~48時間程度インキュベートすることにより行うことができる。なお、磁性ビーズ上への抗体又はその抗原結合性断片の固定化は、物理吸着に限定されるものではなく、他の公知の方法、例えば磁性ビーズ上に結合されたアミノ基やカルボキシル基等の官能基を利用して共有結合させる方法等を採用することも可能である。

## 【0013】

一方、間接法は、ガン細胞と、標識した又は標識していない抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片とを抗原抗体反応させて、該抗体又はその抗原結合性断片を細胞に結合させ、次いで若しくはこれと同時に、該抗体若しくはその抗原結合性断片又はこれに結合されている標識と、磁性ビーズとの特異的反応により、該抗体又はその抗原結合性断片を介して細胞を磁性ビーズに結合させる方法である。標識していない抗体又はその抗原結合性断片を用いる場合には、磁性ビーズには、該抗体又はその抗原結合性断片と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を固定化する。例えば、ガン細胞と反応させる抗SF-25抗体がマウス IgG である場合には、磁性ビーズに抗マウス IgG 抗体を固定化することができる。また、標識抗体又はその抗原結合性断片をガン細胞に結合させる場合には、その標識に対する抗体若しくはその抗原結合性断片又は該標識と特異的に結合する物質を磁性ビーズに固定化する。したがって、標識としては、抗原性を有し、ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を妨害しないものであれば、いずれのものをも採用することができる。例えば、下記実施例では、蛍光標識として周知のフルオレッセインイソチオシアネート (FITC) を標識として抗SF-25モノクローナル抗体に結合し、このFITCを、抗FITC抗体固定化磁性ビーズに結合させている。あるいは、標識としてビオチンを用い、アビジン又はストレプトアビジンのようなアビジン誘導体を固定化した磁性ビーズにビオチンを結合させてもよい。したがって、標識としては、また、ビオチンのような、他の物質と特異的に結合可能であり、ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を妨害しないものであれば、いずれのものをも採用することができる。なお、間接法で用いられる、抗マウス IgG 抗体固定化磁性ビーズ、抗FITC抗体固定化磁性ビーズ及びストレプトアビジン固定化磁性ビーズ等は、免疫測定分野で広く用いられており、汎用性が高いので市販もされている。本発明の方法では、これらの市販の磁性ビーズを好ましく用いることができる。

## 【0014】

本発明の方法により、検査を行うことができるガン細胞としては、その表面上にSF-25抗原を発現しているガン細胞であれば、いずれのガン細胞であってもよく



、白血病細胞、大腸ガン細胞、胃ガン細胞、肺ガン細胞、乳ガン細胞、膵臓ガン細胞及び肝臓ガン細胞を挙げることができる。白血病細胞としては、ガン化したリンパ球や単核球を挙げることができる。なお、下記実施例では、ガン化した単核球を検査しているが、ガン化した単核球上にSF-25抗原が発現していることはこれまでに知られていなかった。

#### 【0015】

本発明の好ましい態様では、被検試料として血液又は血液から分離された細胞が用いられる。上記した各種ガン細胞のうち、白血病細胞は、血液中に含まれているから、血液又は血液から分離された細胞が本発明の方法の対象になるのは当然であるが、大腸ガン細胞、胃ガン細胞、肺ガン細胞、乳ガン細胞、膵臓ガン細胞及び肝臓ガン細胞等の固形ガン細胞も、組織から剥離した細胞が血液、脳脊髄液、骨髓、胸水、腹水、脾液、十二指腸液、胆汁又は尿中に含まれているので、血液を利用してこれらの固形ガン細胞の検査も本発明の方法により可能になる。固形ガン細胞を、臓器組織から採取する場合には、生検が必要となるが、本発明の方法によれば、臓器組織の生検に比べてはるかに採取が容易で安全な血液を被検試料として用いることができるので有利である。

#### 【0016】

直接法の場合、抗体又はその抗原結合性断片が固定化された磁性ビーズとガン細胞との抗原抗体反応の条件は、特に限定されないが、対象となる細胞（正常細胞とガン細胞の混合物）が既に分離されている場合には、細胞浮遊液と磁性ビーズとを、例えば、4℃～45℃程度の温度下で0.5時間～24時間程度接触させることにより行うことができる。この場合の、混合物中の細胞密度は、特に限定されないが、通常、1個/ml～10<sup>6</sup>個/ml程度であり、また、磁性ビーズの濃度は、特に限定されないが、通常、0.1重量%～10重量%程度である。また、血液を磁性ビーズと接触させる場合には、例えば、4℃～45℃程度の温度下で0.5時間～24時間程度接触させることにより行うことができる。この場合の、混合物中の磁性ビーズの濃度は、上記と同様でよい。間接法の場合、ガン細胞と抗原抗体反応させる抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片の濃度は、特に限定されないが、通常、0.001重量%～1重量%程度であり、また、抗原抗体反応の条件は

、ガン細胞と抗SF-25抗体若しくはその抗原結合性断片との反応、及び、生成された抗原抗体複合物と、磁性ビーズ上の抗体又はその抗原結合性断片との反応のいずれも、上記した直接法と同様な条件下で行うことができる。また、間接法の場合、ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を先ず行い、ついで、生成された抗原抗体複合物を磁性ビーズと反応させてもよいし、ガン細胞、抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片及び磁性ビーズを共存させて上記2つの反応を並行して行わせてもよい。また、標識として、ビオチン等の特異結合性物質を用いる場合には、各標識にとって周知の条件で反応を行えばよい。

#### 【0017】

次いで、磁性ビーズを磁力により集める。上記の通り、磁性ビーズを用いた免疫測定法は周知であり、磁力により磁性ビーズを収集するための装置も市販されているので、市販の装置を用いて容易に行うことができる。あるいは、単に磁石を用いて手動で行うこともできる。

#### 【0018】

以上の工程により、表面上にSF-25抗原を発現している細胞が磁性ビーズに結合される。次に磁性ビーズに結合されたガン細胞の検査を行う。なお、検査に先立ち、磁性ビーズを緩衝液で洗浄し、磁力により再度収集する、洗浄工程を行うことが好ましい。細胞の検査自体は、各ガン細胞について公知の方法により行うことができる。例えば、遺伝子検査、病理検査、生理学的検査等、各ガン細胞であることを同定することができる検査を行う。下記実施例では、成人T細胞白血病(ATL)患者由来の単核球からDNAを採取し、プロウイルス化した、ATLの原因ウイルスであるHTLV-Iの遺伝子をインバースPCR及びその後のサザンブロット法により検出することにより、ATLの診断を行っている。このような病原ウイルスや、各種ガンのマーカー遺伝子を検出する遺伝子検査を好ましい例として挙げることができる。例えば、HTLV-1(ATL)、Rb(網膜芽細胞腫、肺癌、乳癌)、p53(大腸癌、乳癌、肺癌など)、WT1(Wilms腫瘍)、APC(大腸癌、胃癌)、p1b(悪性黒色腫、食道癌)、NFI(悪性黒色腫、神経芽腫)、NF2(髄膜腫、食道癌)、VHL(腎臓癌)、DPC-4(膵臓癌)、SMAD2(大腸癌)、PTEN(神経膠芽腫)、PTC(皮膚基底細胞癌)、int-2/hst-1/cycD1(頭頸部癌、食道癌、膀胱癌)、MDM-2(肉腫、脳腫瘍)、

erbB1 (多型グリオーマ、乳癌)、erbB2(neu) (乳癌、胃癌、卵巣癌)、c-myc (子宮癌、肺小細胞癌、乳癌)、N-myc (神経芽細胞腫、肺小細胞癌、肉腫)、H-ras (子宮癌)、K-ras(胃癌)、c-met (胃癌)、K-sam (胃癌)、AKT-1, AKT-2(S/T-PK) (ともに胃癌、卵巣癌)、Aurora-2(S/T-PK) (大腸癌) を挙げることができる。さらに、遺伝子検査以外でも、例えば、EGF受容体 (乳癌等)、p53タンパク (大腸癌、肝臓癌)、血管上皮増殖因子(VEGF) (肝臓癌、大腸癌等)、TGF- $\beta$ 、annexin'-I等のような検査を例示することができる。

### 【0019】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

### 【0020】

#### 参考例1 ATLの検出

##### 1. 試料の調製

急性ATL患者7名、慢性ATL患者5名、くすぶり型ATL患者9名、健常ATLキャリア42名及び健常人 (HTLV-1非感染者) 8名の末梢血から単核球を分離した。単核球の分離は、具体的に次のようにして行った。Lymphaprep(商品名) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)5mlを遠心管にとり、前記対象からえられたヘパリン加静脈血5mlを静かに重層する。その後400g、30分遠心し血漿と分離液の間に帯上に浮遊する単核球を毛細管ピペットで回収した。回収した単核球をリン酸バッファー生理食塩水(PBS)を用いて3回遠心洗浄し、以下の実験に用いた。

### 【0021】

##### 2. フローサイトメトリー

マウス抗SF-25モノクローナル抗体(ATCC No. HB9599により産生)を常法により、FITCで標識し、得られた蛍光標識抗SF-25モノクローナル抗体を用い、上記1で分離した単核球についてフローサイトメトリーを行った。フローサイトメトリーは、具体的に次のようにして行った。PBS中に $5 \times 10^6$ /mlとなるよう調整した単核球浮遊液から、0.1mlずつ2本の小試験管に分注し、1本には希釈した蛍光標識抗SF-25モノクローナル抗体を10 $\mu$ l加え、他の1本には同様にFITC標識マウス

IgG1を $10\mu\text{l}$ 加えた。10分ごとに静かに混和させながら、 $4^{\circ}\text{C}$ 30分間反応させた。反応終了後PBSを加え、2回遠心洗浄後フローサイトメーター(EPICS XL(商品名)、Coulter, Miami, Florida, U.S.A.)にアプライし、FITC標識マウスIgG1をコントロールとして約1万個の細胞をカウントし陽性細胞の比率を求めた。

## 【0022】

上記フローサイトメトリーにより、全単核球中の、SF-25抗原を発現している単核球の割合を計測した。結果を下記表1及び図1に示す。

## 【0023】

【表1】

表1

被検対象	急性 ATL 患者	慢性 ATL 患者	くすぶり型 ATL 患者	健常 HTLV-I キャリア	健常人
SF-25 抗原発現単 核球の割合(%) (平 均值)	42.7	27.9	15.2	0.6	0.4

## 【0024】

表1及び図1から明らかなように、単核球上のSF-25抗原をマーカーとして利用することにより、ATLについて、健常人+健常キャリアの群と、急性+慢性+くすぶり型の群とは明瞭に区別することが可能である。

## 【0025】

実施例1 磁性ビーズを用いたSF-25抗原発現単核球の収集及びその遺伝子検査

SF-25抗原を発現している単核球の染色体DNAに、HTLV-I遺伝子がプロウイルス化して挿入されているか否かをインバースPCR及びサザンブロットにより調べた。これらは、具体的に次のようにして行った。

## 【0026】

## (1) SF-25抗原発現単核球の収集

くすぶり型ATL患者の末梢血から上記のようにして分離した単核球 $10^7$ をリン酸

緩衝食水 (pH 7.2、0.5%牛血清アルブミンおよび2mM EDTAを含む)以下バッファー) 60  $\mu$  lに浮遊させた。次に、FITC標識したマウス抗SF-25モノクローナル抗体(ATCC No. HB9599により産生)溶液 (濃度0.1%) 10  $\mu$  lを加え4℃5分間反応させ、2回洗浄し未吸着の抗体を除去した。この細胞に90  $\mu$  lのバッファーを加え再浮遊させ、10  $\mu$  lの Anti-FITC マイクロ磁性ビーズ(Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Germany 粒子直径50nm)を加え、6℃15分間標識し、SF-25抗原を表面に有する単核球を磁性ビーズと結合させた。未吸着の磁性ビーズを除去するため細胞を2回洗浄後、500  $\mu$  lのバッファーに再浮遊させた。マックスミディセット(Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Germany) を用いて、この細胞をMACS分離ポジティブセレクションMSカラム(Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Germany) (一度バッファー500  $\mu$  lで洗浄したもの) にアプライし、磁力により磁性ビーズで標識された細胞 (SF-25抗原陽性細胞) と磁性ビーズで標識されなかった細胞 (SF-25抗原陰性細胞) を分画し、以下の実験で検体として用いた。

### 【 0 0 2 7 】

#### (2) インバースPCR

Takemoto Sらによる報告 (Blood Vol 84 No9 3080-3085, 1994) に基づき以下のように行った。DNAzol (Molecular Research Center, Inc., Montgomery Rd., Cincinnati, Ohio.)を用いて各検体より染色体DNAを抽出し、このDNAをSau 3AIを用いて切断し、T4 DNA ligaseをもちいてセルフライゲーションを行った。この方法により、HTLV-1 5' LTR及びgag sequenceからなるものと、HTLV-1 3' -LTRと染色体DNAからなるものとができる。HTLV-1の5' proviral DNAからなるものを除く目的で、Sac IIで加熱処理した。このDNAをテンプレートとしてprimer 1 ; primer 1: 5'-aagccggcagtcagtcgtga-3' (HTLV-I 塩基配列の8946-8927)、primer 2: 5'-aagtaccggcaactctgtg-3' (HTLV-I 塩基配列の8958-8977)で第一段階のPCRを行い、次いでnested primerとして 3: 5'-gaaagggaaaggggtggaac-3' (HTLV-I 塩基配列の8924-8905) primer 4: 5'-ccagcgacagcccattctat-3'. (HTLV-I 塩基配列の8986-9005) で第二段階のnested PCRを行った。各PCRはThermal Cycler を用いて94℃20秒、55℃20秒、72℃30秒のサイクルを第一段階は50回

、第二段階は35回行った。このPCR産物 5mlをとり2% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、バンドを確認しHTLV-Iのクローナルな組み込みの有無をみた。

#### 【0028】

##### (3) サザンブロット

上記の泳動産物を、ナイロンメンブランフィルターにトランスファーし、オリゴヌクレチド(5'-ctccaggagagaaatttagtacac-3' HTLV-I塩基配列の9012-9035)をプローブとしてHTLV-Iの組み込みを確認した。Takemotoらによる報告によると、この方法により染色体遺伝子を含むHTLV-1の3' LTRのU5領域が増幅されると考えられる。ATL患者におけるHTLV-1遺伝子の組み込みは各症例間でランダムであるが、1人の患者ATL細胞におけるHTLV-1遺伝子の組み込みはモノクローナルであり、染色体DNAを含むHTLV-1の3' LTRのU5領域を増幅することで、モノクローナルな増殖であるか否かを決定できる。事実彼らは染色体DNAを含むHTLV-1の3' LTRのU5領域のDNA sequenceを行うことによりそのことを確認している。

#### 【0029】

その結果、SF-25抗原を発現する単核球では、HTLV-Iプロウイルス化DNAが、モノクローナルに組み込まれており、SF-25陰性細胞では、HTLV-Iのプロウイルス化は検出されなかった。このことから、本発明の方法により、本発明の方法で、急性、慢性及びくすぶり型ATLが検出できることが確認された。

#### 【0030】

##### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、セルソーターのような高価な装置を用いることなく、簡便に効率良くガン細胞の検査を行うことができる。磁性ビーズの収集は、磁石を用いた装置又は磁石を用いて手動で行うことができ、セルソーターを用いる場合に比べて遥かに安価に行うことができる。また、磁性ビーズを用いた本発明の方法では、セルソーターを用いる場合に比べ、収集される細胞の純度が高く、すなわち、SF-25抗原発現細胞のみを的確に収集することができ、このため、その後の検査も効率良く正確に行うことができる。

## 【0 0 3 1】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

- <110> TAKAHASHI Hiroshi et al.  
<120> Method for Detecting Leukemia and Reagent therefor  
<130> 02810  
<160> 5

## 【0 0 3 2】

- <210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide forward primer used in inverse PCR for amplifying  
a region of HTLV-1 gene  
<400> 1  
aagccggcag tcagtcgtga 20

## 【0 0 3 3】

- <210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide reverse primer used in inverse PCR for amplifying  
a region of HTLV-1 gene  
<400> 2  
aagtaccggc aactctgctg 20

## 【0 0 3 4】

- <210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide forward primer used in inverse PCR for amplifying  
a region of HTLV-1 gene

<400> 3

gaaagggaaa ggggtggaac

20

【 0 0 3 5 】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide reverse primer used in inverse PCR for amplifying  
a region of HTLV-1 gene

<400> 4

ccagcgacag cccattctat

20

【 0 0 3 6 】

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide probe used for detecting a region of HTLV-1 gene

<400> 5

ctccaggaga gaaatttagt acac

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】



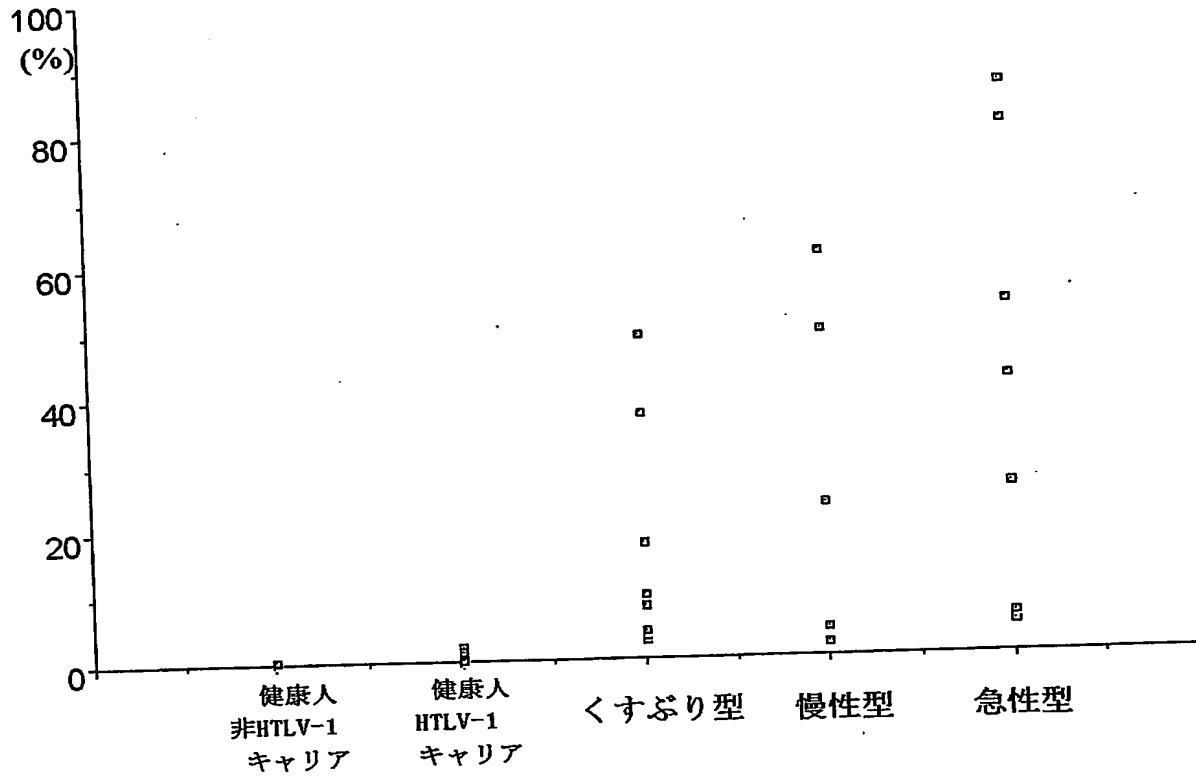
本発明の実施例において、急性ATL患者、慢性ATL患者、くすぶり型ATL患者、健常ATLキャリア及び健常人（HTLV-1非感染者）の末梢血中の単核球を被検試料とし、抗SF-25モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定した、全単核球中のSF-25抗原陽性単核球の割合を示す図である。

【書類名】

図面

【図1】

各病型での末梢血単核球中のSF-25陽性細胞



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高価な装置を用いることなく、簡便に効率良くガン細胞の検査を行うことができる方法及びそのための試薬を提供すること。

【解決手段】 SF-25抗原を細胞表面上に発現している、生体から分離されたガン細胞を、該ガン細胞と抗SF-25抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用して磁性ビーズに結合させ、次いで、磁性ビーズを磁力により集め、磁性ビーズ上に結合された前記ガン細胞を検査することを含むガン細胞の検査方法を提供した。

【効果】 セルソーターのような高価な装置を用いることなく、簡便に効率良くガン細胞の検査を行うことができる。また、磁性ビーズを用いた本発明の方法では、セルソーターを用いる場合に比べ、収集される細胞の純度が高く、すなわち、SF-25抗原発現細胞のみを的確に収集することができ、このため、その後の検査も効率良く正確に行うことができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号  
受付番号  
書類名  
担当官  
作成日

特願 2 0 0 2 - 3 2 6 1 9 3  
5 0 2 0 1 6 9 4 4 2 5  
特許願  
第一担当上席 0 0 9 0  
平成 1 4 年 1 1 月 1 4 日

< 認定情報・付加情報 >  
【提出日】

平成 14 年 11 月 8 日

次頁無

特願 2002-326193

出願人履歴情報

識別番号

[502405631]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

2002年11月 8日  
新規登録  
埼玉県岩槻市大字柏崎808  
高橋 弘

特願2002-326193

出願人履歴情報

識別番号

[502406384]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

2002年11月 8日

新規登録

鹿児島市桜ヶ丘六丁目39番11号

花田 修一

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**